A. 0. 1035

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Nicole SICARD née ALIHU

PREMIÈRE THÈSE

ETUDE DES EFFETS LETAUX DE LA CARENCE EN THYMINE CHEZ LES BACTERIES

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

DONNEES RECENTES SUR LE SORT DU DNA TRANSFORMANT DANS LA BACTERIE RECEPTRICE

Soutenues le 28 juin 1966 devant la Commission d'examen

MM. L'HERITIER Président

CHAPEVILLE
GROS
} Examinateurs

A. 0. 1035

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Nicole SICARD née ALIHU

PREMIÈRE THÈSE

ETUDE DES EFFETS LETAUX DE LA CARENCE EN THYMINE CHEZ LES BACTERIES

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

DONNEES RECENTES SUR LE SORT DU DNA TRANSFORMANT DANS LA BACTERIE RECEPTRICE

Soutenues le 28 juin 1966 devant la Commission d'examen

MM. L'HERITIER Président

CHAPEVILLE, GROS } Examinateurs

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

Janvier 1966

PROFESSEURS

Le Doyen ..... M. ZAMANSKY

PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparée
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minéralogie et cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
AUGER	T	Physique quantique et relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique E. N. S.
CARTAN	T	Mathématiques E. N. S.
LAFFITTE	T	Chimie générale
N ...	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du globe
Mlle COUSIN	T	Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique E. N. S.
EPHRUSSI	T	Génétique
GAUTHERET	T	Biologie végétale CPEM
LUCAS R.		Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET	T	Physique CPEM
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T	Zoologie
QUENEY	T	Météorologie et dynamique de l'atmosphère
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale SPCN
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du globe
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microsocopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théorie physique
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et cristallographie
MATHIEU J. P.	T	Physique optique
COUTEAUX	T	Cytologie
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (technique aéronautique)
BRELOT	T	Analyse supérieure
NORMANT	T	Synthèse organique
BENARD	T	Chimie appliquée
DUGUE	T	Statistique mathématique
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANÇON	T	Physique SPCN
GLANGEAUD	T	Géographie physique, géologie dynamique
DODEMENT	T	Mathématiques MGP
PISOT	T	Technique mathématique de la physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMANN	T	Astrophysique

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546821_0030

TERMIER	T	Géologie générale
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique M. G. P.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques M. P. C.
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique
BRUSSET	T	Chimie systématique
LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies
Mme CHAIX	T	Chimie biologique
Mme HUREL PY	T	Biologie végétale CPEM
PANNETIER	T	Chimie générale I
BRUN	T	Mécanique des fluides I
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrégation)
Mme LELONG	T	Mathématiques II E. N. S.
BELLAIR	T	Géologie S. P. C. N.
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J. E.	T	Chimie organique physique
LAMOTTE	T	Zoologie E. N. S.
OLMER	T	Energétique générale
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie végétale
CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie quantique
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radioactivité
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie CPEM
FREYMANN	T	Recherches physiques
ROLLET	T	Chimie minérale
Mlle JOSIEN	T	Chimie SPCN
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales
BRICARD	T	Météorologie
Mme ALBE-FESSARD	T	Psycho-physiologie
JULIA M.	T	Etude des molécules naturelles complexes
MAGAT	T	Physico-chimie des rayonnements
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
CHATELET	T	Chimie CPEM
MATTLER	T	Physique SPCN
BOUISSIERES	T	Radiochimie
Mme COUTURE	T	Thermodynamique et mécanique physique
FRANC	T	Biologie animale CPEM
SCHNELL	T	Botanique tropicale
STOLKOWSKI	T	Physiologie générale
ACHER	T	Chimie biologique
BAUDOIN	T	Biologie animale CPEM
BEAUMONT		Biologie animale SPCN
BLAMONT		Géophysique ionosphère
BOUREAU	T	Botanique
CURIE D.		Physique MGP
DURAND DELGA	T	Géologie
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des probabilités
CAILLEUX	T	Géologie SPCN
MAGNAN		Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire
Mlle FOURCROY		Biologie végétale SPCN
Mme CHOQUET-BRUHAT		Mécanique analytique et mécanique céleste
Mlle VEIL	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale
CABANNES	T	Mécanique générale
CAIRE	T	Géographie physique et géologie dynamique
COMOLET		Mécanique des fluides
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
HOUILLON		Biologie animale CPEM
OLIVIER		Anthropologie
SAMUEL	T	Mathématiques (ENS Jeunes filles)
THIRY	T	Mécanique céleste
ABELES	T	Physique SPCN
AMAT	T	Thermodynamique
AUBOIN	T	Géologie
Mme BENOIT-GUEUTAL	T	Physique nucléaire et radioactivité
BOUGIS		Biologie végétale marine, Villefranche-sur-Mer
RIGAUDY	T	Chimie SPCN
COLLONGUES		Chimie CPEM
DUBERT		Biochimie
NOZIERES		Physique générale
CADIOT		Chimie organique
IVANOFF		Océanographie physique
FRANÇOIS		Zoologie
TALBOT		Génie chimique
Mme NOUGAREDE		Botanique
BRUHAT	T	Mathématique MPC

FOURNET		Electricité générale
DEHEUVELS	T	Mathématiques propédeutique
FURON	T	Géologie SPCN
Mme GANS	T	Génétique
GENEVES		Biologie végétale CPEM
HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE	T	Chimie organique
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER	T	Pétrographie
MOREL F.	T	Physiologie comparée
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE		Electronique E.S.E.
SILBER	T	Chimie CPEM
UEBERSFELD	T	Electronique
YVON	T	Théories physiques
HERVE	T	Mathématiques
Mme PECKER-WIMEL	T	Astrophysique
BALKANSKI		Physique M.P.C.
LE CORRE	T	Electricité
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité
ECHALIER		Biologie animale CPEM
BARRAUD	T	Physique CPEM
DARS		Géologie structurale et appliquée
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation)
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
SIGWALT	T	Chimie SPCN
BLAQUIERE		Electronique
BARUCH		Physique propédeutique
ARNOUS	T	Physique théorique
SLONIMSKI		Génétique
MALLIAVIN	T	Mathématiques propédeutique
GAUDEMAR		Chimie propédeutique
BROUSSE	T	Mécanique théorique
ROSCH	T	Astronomie
GUY	T	Physique expérimentale
LAZARD		Mathématiques MPC
MOREL P.		Physique MPC
ARSAC		Programmation
LEFEBVRE		Chimie MPC
BOK		Physique propédeutique
CHAPEVILLE		Biochimie
BENOIT		Physique CPEM
RIO		Chimie CPEM
JAUZEIN		Géologie ENS
PREVOST G.		Biologie végétale CPEM
FAVARD P.		Biologie animale CPEM
Mme CHARNIAUX-COTTON		Evolution des êtres organisés
Mlle FICINI		Chimie CPEM
LEQUEUX		Astronomie
COHEN TANNOUDJI		Physique atomique
TAVERNIER		Physique CPEM
DURAND Michel		Biologie animale SPCN
PASCAUD		Physiologie
Mme PETIT		Biologie animale CPEM
CAGNAC		Physique agrégation
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire
KRASNER	T	Mathématiques
BENZECRI	T	Statistiques
VINH MAU		Physique M.G.P.
DUQUESNES		Physique CPEM
SCHUTZENBERGER		Programmation
TREMILLON		Chimie MPC
FAYARD		Chimie MPC
BUVET		Chimie CPEM
AUTHIER		Physique MPC
PICINBONO	T	Physique CPEM
BONNEFILLE		Electrotechnique
Mme PUISEUX DAO		Biologie végétale

Le Secrétaire Général,

R. POULLAIN

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

Janvier 1966

PROFESSEURS

MANGENOT G.	T	Biologie végétale
JACQUINOT P.	T	Optique
GUINIER A.	T	Electricité et physique des solides
GRIVET P.	T	Electronique
BLANC-LAPIERRE A.	T	Accélérateur linéaire
L'HERITIER P.	T	Génétique des virus
LEMEE G.	T	Ecologie végétale
MOYSE A.	T	Physiologie végétale
DODE M.	T	Chimie thermodynamique
DENY J.	T	Mathématiques
RIVIERE A.	T	Géologie générale et sédimentologie
MICHEL A.	T	Chimie minérale
MAY R.	T	Anatomie comparée
DELANGE H.	T	Mathématiques
CHAPELLE J.	T	Physique expérimentale
LACOMBE P.	T	Métallurgie
BENOIT P.	T	Physiologie générale
GUINOCHET J.	T	Biologie végétale SPCN
NERON A.	T	Mathématiques
NOZERAN R.	T	Botanique approfondie
CASTAING R.	T	Thermodynamique
ELLENBERGER F.	T	Géologie structurale
LEDERER E.	T	Chimie biologique
RIZET J.	T	Génétique
LENDER T.	T	Biologie animale SPCN
POITOU G.	T	Mathématiques
FREON P.	T	Chimie organique
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
BRUNN Jan	T	Géologie historique
JEAN M.	T	Physique nucléaire
BERGERARD J.	T	Zoologie
ROGER J.	T	Paléontologie
LEFORT M.	T	Chimie nucléaire
LAGARRIGUE A.	T	Physique des hautes énergies
JULLIEN J.	T	Chimie structurale organique
ARNULF A.	T	Optique
ROUAULT M.	T	Diffraction électronique
MARECHAL A.	T	Optique théorique et appliquée
MAZET R.	T	Mécanique générale
DAVID Serge	T	Chimie agrégation
GUERIN H.	T	Chimie des gaz et des combustibles
LESIEUR L.	T	Mathématiques MPC et algèbre
KOURGANOFF	T	Astronomie
ARNOULT P.	T	Physique électronique
KAHANE J. P.	T	Mathématiques
BROCHARD J.	T	Physique propédeutique
Mme ROIZEN	T	Physique CPEM
BERTEIN F.	T	Electronique
MALGRANGE B.	T	Mathématiques
CORABOEUF E.	T	Physiologie animale
FRIEDEL J.	T	Physique des solides
CHEVAUGEON J.	T	Cryptogamie
MEYER P.	T	Physique théorique et atomique
LEHMANN P.	T	Accélérateur linéaire
CHABBAL R.	T	Physique propédeutique
DELCROIX J. M.	T	Physique des plasmas
CERF J.	T	Mathématiques
D'ESPAGNAT B.	T	Physique théorique
SCHAEFFER P.	T	Microbiologie
DE GENNES P.	T	Physique des solides
Mme MARTY N.		Physique propédeutique
GOURDIN M.		Physique théorique
PEREZ-Y-JORBA		Physique propédeutique
GORENFLOT E.		Biologie végétale SPCN
RIOU M.		Physique nucléaire
BROUSSE R.		Géologie SPCN
LIORET C.		Physiologie végétale
CLAUSER H.		Chimie Biologique
JANCOVICI B.		Physique atomique
LURCAT J.		Physique propédeutique
LE BERRE J.		Entomologie
LAVOREL J.		Biophysique
PERIO P.		Physique propédeutique
FETIZON M.		Stéréochimie
CHEMLA M.		Chimie des isotopes
MAZIERES C.		Chimie SPCN
VILKAS M.		Chimie CPEM
BLANDIN A.		Physique des solides
BRUN G.		Génétique
MERCOUROFF		Physique agrégation
ANDRE J.		Microscopie électronique
CHEVALLIER F.		Physiologie animale
Mlle MARCOU		Biologie cellulaire CPEM

BOURDU R.	Physiologie végétale	Mme LAMBERT	Physique CPEM
BERKALOFF A.	Biologie animale CPEM	BIZOT J. C.	Physique MPC
		GUIRAUD J. P.	Mécanique
Mlle LEFORT M.	Biologie cellulaire CPEM	LABOUESSE	Chimie SPCN

X-RAY SENSITIVITY OF SYNCHRONOUS CULTURES OF A THYMINELESS MUTANT OF ESCHERICHIA COLI.

G. E. Stapleton and Nicole A. Sicard. Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.

Numerous investigations have been made on the radiosensitivity changes that occur during the mitotic cycle of a variety of types of living cells. The advent of synchronous cultures of bacteria presented the possibility of making similar studies with these cells. Logarithmic cultures of a thymineless mutant of Escherichia coli (15) grown in a mineral medium with thymine can be induced to divide synchronously if they are incubated in the absence of the requirement after being washed, and then later are supplied with the pyrimidine. If thymine is withheld for more than 30 minutes at 37 C the culture dies, reportedly owing to "unbalanced growth." RNA and protein synthesis goes on during the withholding period in the absence of DNA synthesis. Upon addition of thymine, however, DNA increases abruptly, followed by rapid cell division at a later time. Aliquots were removed from such cultures at frequent intervals, and irradiated with 250-kvp X rays (26 kr in 3 min) under conditions similar to the growing culture. Determination of radiosensitivity was based on the relative viable cell counts on nutrient agar after irradiation. Although large changes in radiosensitivity were measured as a function of the incubation time during the first synchronous division, it is difficult to correlate the sensitive periods with either the onset of DNA synthesis or of cell division. Details of the findings will be discussed.

Abstract for Society of American Bacteriologists, Chicago, Illinois, April 27-May 1, 1958.

Bacteriol. Proc., p. 34, 1958

PHYSIOLOGIE MICROBIENNE. — *Rôle des synthèses macromoléculaires sur la viabilité d'*Escherichia Coli 15 T⁻ *et* 15 T⁻ H⁻. Note de M^me^ Nicole Sicard, transmise par M. Robert Courrier.

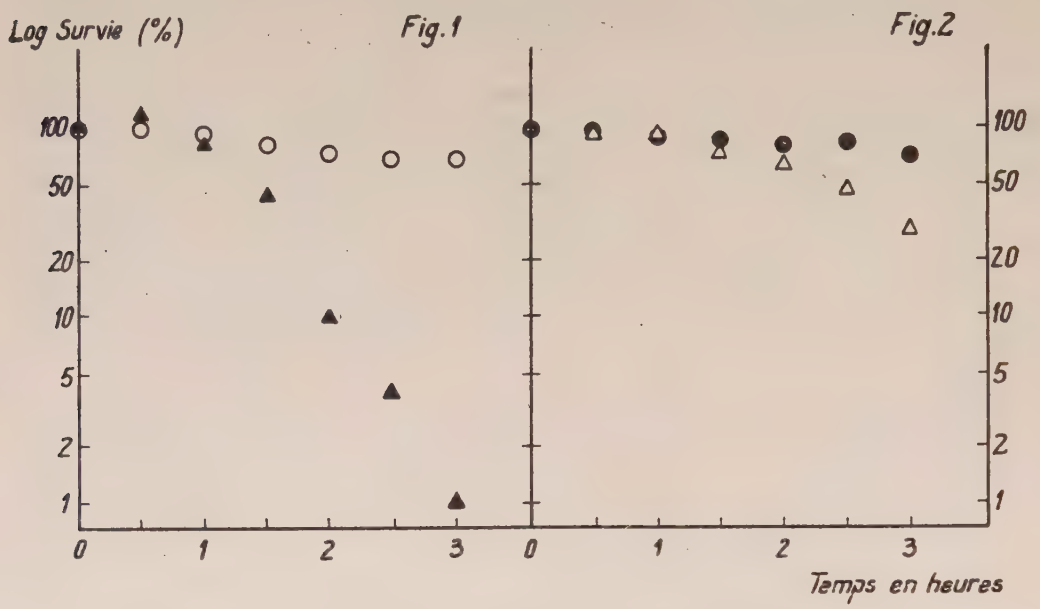
La diminution de viabilité d'*Escherichia Coli* 15 Thymine-(T⁻) et d'*Escherichia Coli* 15 Thymine⁻ Histidine⁻ (T⁻H⁻), en l'absence de thymine, paraît résulter d'un déséquilibre entre les synthèses macromoléculaires. En l'absence de synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN), la synthèse d'acide ribonucléique (ARN) n'est pas léthale; au contraire, la synthèse de protéines joue un rôle important dans le processus de mortalité de cet organisme.

En l'absence de thymine, un mutant d'*E. Coli* (15 T⁻) perd progressivement l'aptitude à former des colonies ([1]). Barner et Cohen supposent que cette mortalité est une conséquence de l'inhibition de la synthèse de l'ADN pendant que les synthèses cytoplasmiques se poursuivent. Dans la présente Note nous avons envisagé l'importance particulière de la synthèse de l'ARN et de celle des protéines. Les résultats montrent que seule la synthèse des protéines, en l'absence de synthèse d'ADN, est léthale.

Deux souches sont utilisées : *E. Coli* 15 T⁻ et *E. Coli* 15 T⁻ H⁻. Ce dernier mutant se comporte comme le mutant simple, si on le prive de thymine seulement ([2]). Pour inhiber la synthèse des protéines, on utilise une solution fraîche de chloromycétine ([3]) à la concentration de 10 γ/ml. Des cultures en phase exponentielle sont lavées et remises en suspension dans un milieu minimal contenant ou non thymine, histidine et chloromycétine suivant les cas. Des échantillons sont prélevés toutes les 30 mn pour déterminer le nombre de bactéries capables de se multiplier et pour estimer les variations de quantités d'ADN et d'ARN présentes dans la suspension [méthodes décrites par Burton ([4]) et Volkin et Cohn ([5]) respectivement]. Pour évaluer la synthèse des protéines on effectue des prélèvements, toutes les heures, d'une culture à laquelle on a ajouté du soufre radioactif (^{35}S) sous forme de sulfate. On recueille les échantillons dans de l'acide trichloracétique froid. Après lavage à l'acide trichloracétique et remise en suspension dans de l'ammoniaque au tiers, on mesure la radioactivité, fonction de l'incorporation de ^{35}S dans les protéines.

Barner et Cohen ([2]) avaient observé que, pour plusieurs doubles mutants, une carence simultanée en aminoacide et en thymine réduisait la mortalité de ces bactéries. Nos expériences, effectuées avec une souche T⁻H⁻ ont confirmé ces résultats. Il nous a paru intéressant de rechercher si cette protection était due à l'arrêt de la synthèse de l'ARN ou à l'arrêt de la synthèse des protéines. A cet effet, nous avons repris en détail l'analyse de ce problème. Pour pouvoir choisir entre ces deux mécanismes de protection, nous avons étudié l'effet de la chloromycétine sur la mortalité provoquée par carence en thymine. On sait, en effet, que cet antibiotique

permet la synthèse de l'ARN mais inhibe la synthèse des protéines. Billen (6) avait précisément mentionné que la chloromycétine abaissait la mortalité d'*E. Coli* 15 T⁻ due à l'absence de thymine. L'expérience montre que la chloromycétine protège, mais elle doit intervenir un certain temps avant la carence en thymine, pour que l'efficacité soit maximale. Pour le mutant 15 T⁻H⁻, on peut remplacer l'addition préalable de chloromycétine par une carence en histidine, ce qui diminue la synthèse des protéines et de l'ARN.



Cultures d'*E. Coli* 15 T⁻H⁻ carencées en histidine pendant 1 h puis remises en suspension dans un milieu minimal, sans thymine.

Fig. 1 : ○ + chloromycétine + histidine;
▲ — chloromycétine + histidine;
Fig. 2 : ● + chloromycétine — histidine;
△ — chloromycétine — histidine.

A une culture d'*E. Coli* 15 T⁻ ou 15 T⁻H⁻ on ajoute de la chloromycétine 1 h avant de laver les bactéries et de les remettre en suspension dans un milieu sans thymine mais renfermant de la chloromycétine. 70 à 80 % des bactéries sont encore capables de se multiplier au bout de 3 h. Il en est de même si l'on carence en histidine une culture d'*E. Coli* 15 T⁻H⁻ pendant 1 h avant de les remettre en suspension dans un milieu sans thymine mais en présence d'histidine et de chloromycétine. Sans addition de chloromycétine, la chute de viabilité est rapide (*fig.* 1). Or, dans tous les cas envisagés au cours de la carence en thymine, la quantité d'ARN double approximativement, alors que l'augmentation d'ADN n'atteint pas 20 %. L'incorporation de ^{35}S, très faible en présence de chloromycétine, est très importante en son absence puisque la radioactivité, au bout de 3 h devient 12 fois plus forte. Les quantités d'ARN formé étant

identiques dans tous les cas, on ne peut attribuer les différences de viabilité au rôle de la synthèse d'ARN en l'absence de synthèse d'ADN. Par contre, lorsque la synthèse de protéines est restreinte par suite de la présence de chloromycétine dans le milieu de culture, la mortalité est minime. Lorsque la chloromycétine est absente du milieu, il y a synthèse de protéines et la léthalité est plus importante.

La carence en histidine protège moins efficacement que la chloromycétine de l'effet léthal dû à la carence en thymine. Ainsi, après carence en histidine pendant 1 h d'une culture du mutant T^-H^-, suivie de remise en suspension en l'absence de thymine, d'histidine et de chloromycétine, la mortalité atteint 70 % de la population après 3 h (*fig.* 2). Ces résultats, en apparence contradictoires avec ceux décrits précédemment, s'expliquent aisément car, s'il n'y a plus de synthèse d'ARN en l'absence d'histidine, il subsiste encore une notable synthèse de protéines que révèlent les mesures d'incorporation de soufre radioactif : pendant ces 3 h la radioactivité triple, alors qu'en ajoutant de la chloromycétine elle n'augmente que de 50 %.

En conclusion, chaque fois qu'on observe une réduction de viabilité par carence en thymine, c'est-à-dire en l'absence de synthèse d'ADN, il y a synthèse de protéines, qu'il y ait ou non synthèse d'ARN. Qui plus est, il semble que l'importance de la réduction soit liée à l'importance de la synthèse des protéines; l'étude systématique de l'incorporation de substances marquées, dans les acides nucléiques et les protéines de ces mutants, devrait nous permettre de préciser et d'approfondir ce point.

(1) H. Barner et S. S. Cohen, *J. Bacteriology*, 68, 1954, p. 80-88.
(2) H. Barner et S. S. Cohen, *J. Bacteriology*, 74, 1957, p. 350-355.
(3) E. F. Gale et J. P. Folkes, *Biochem. J.*, 53, 1953, p. 493-498.
(4) K. Burton, *Biochem. J.*, 62, 1956, p. 315-322.
(5) E. Volkin et W. Cohn dans *Methods of biochemical analysis*, vol. 1, 1954, p. 287-303 (éd. David Glick).
(6) D. Billen, *Biochemica et Biophysica Acta*, 34, 1959, p. 110-116.

(*Département de Biologie du Commissariat à l'Énergie Atomique*, B. P. n° 2, *Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise.*)

Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 252, p. 617-619, séance du 23 janvier 1961.

GAUTHIER-VILLARS,
55, Quai des Grands-Augustins, Paris (6e),
Éditeur-Imprimeur-Libraire.
158925

Imprimé en France.

PHYSIOLOGIE MICROBIENNE. — *Effets de la carence en thymine sur des souches d'*Escherichia Coli *lysogènes* K 12 T⁻ *et colicinogène* 15 T⁻. Note de M^me^ Nicole Sicard et M. Raymond Devoret, présentée par M. Antoine Lacassagne.

Lorsque diverses souches d'*Escherichia coli* exigeantes en thymine sont cultivées dans un milieu minimal qui en est dépourvu, on constate que la perte de viabilité des cellules est bien plus rapide si le génôme bactérien possède un épisome inductible tel que le prophage λ chez *E. coli* K 12 ou le facteur colicinogène chez *E. coli* 15 T⁻. La carence en thymine, comme l'irradiation ultraviolette, produit un effet inducteur qui s'ajoute à l'effet létal constamment observé, quelle que soit la souche étudiée.

Des mutants exigeants en thymine (T⁻) peuvent être obtenus chez *Escherichia coli* K 12 selon la technique d'Okada et coll. (¹). Nous avons pu disposer d'un certain nombre de variants de cette souche différant notamment par leur caractère de lysogénie pour le prophage λ (*voir* tableau I).

Nous nous sommes proposé d'étudier l'induction (²) du prophage λ provoquée par la carence en thymine des cellules bactériennes et de la comparer à l'induction par le rayonnement ultraviolet. La carence en thymine est obtenue en cultivant les bactéries à 37°C dans un milieu minimal dépourvu de thymine. D'autre part, nous avons recherché l'existence et éventuellement l'importance de l'induction de la colicine par carence en thymine chez la souche colicinogène *E. coli* 15 T⁻ sensible à sa propre colicine (³).

Nous avons constaté que, chez toutes les souches utilisées, les cellules bactériennes carencées en thymine, après un temps de latence d'environ 30 mn, perdent leur viabilité de façon exponentielle. La rapidité de cette perte de viabilité dépend de la présence dans la bactérie d'un épisome inductible, prophage ou facteur colicinogène.

Les cultures des souches d'*E. coli* K 12 non colicinogènes, non lysogènes ou lysogènes pour le phage non inductible aux ultraviolets (λ ind⁻) (³) ont après 2 h de carence en thymine un taux de survie voisin de 50 %. En revanche, il n'est que de 10 % pour les cultures des souches d'*E. coli* K 12 lysogènes pour le prophage λ du type sauvage inductible par la carence. Après un temps de carence de 2 h 30 mn, le nombre de centres infectieux produits est maximal et égal à 60 % des bactéries initiales; 5 % des bactéries sont alors aptes à former des colonies.

On ne peut détecter, dans les conditions normales de culture d'*E. coli* 15 T⁻, la présence de colicine. Mais la carence en thymine provoque l'induction, létale pour les cellules, du facteur colicinogène. La colicine ne peut être mise en évidence qu'en cultivant à nouveau les cellules dans un milieu minimal additionné de thymine. La quantité de colicine produite est

TABLEAU I.

Survie et induction par carence en thymine

Souches utilisées.	Caractères des souches thymine⁻.	Origine.	Survie (**) (%).	Induction (*).
E. coli K 12 :				
H fr H.....	$(\lambda)^-$	F. J. Ryan	50 ± 10	0
TK 201.....	$Arg^-B_1^-$ $(\lambda)^-$	T. Kada	50 ± 10	0
TK 221.....	$Arg^-B_1^-$ $(\lambda\ ind^-)^+$	Souches dérivées de TK 201	50 ± 10	0
TK 211.....	$Arg^-B_1^-$ $(\lambda)^+$		10 ± 3	+
K 12.....	$(\lambda)^+$	T. Okada	10 ± 3	+
W 1177.....	$Thr^-Leu^-B_1^-$ $(\lambda)^+$	N. Sicard	10 ± 3	+
E. coli 15.....	Colicinogène	Institut Pasteur	10 ± 0,5	+

(*) Le nombre de bactéries survivantes après 2 h de carence en thymine est exprimé en pour-cent du nombre initial.

(**) On mesure l'induction du prophage λ en dénombrant les centres infectieux après étalement sur la souche indicatrice C 600 et incubation à 37° C pendant 18 h. Pour détecter la présence de colicine (4), les échantillons des cultures carencées en thymine doivent être incubés en présence de thymine environ 1 h 30 mn avant d'être traités par le chloroforme; la colicine peut alors être mise en évidence dans le surnageant après centrifugation. La souche indicatrice, répartie en couche très mince de milieu synthétique gélosé est la 15 T⁻ elle-même.

maximale pour des cultures carencées pendant 1 h 30 mn. La survie de la souche est alors de 5 % environ. Les colonies phénotypiquement résistantes à la colicine qu'on peut prélever sur les plages d'inhibition ont, dans les mêmes conditions de carence, une survie comparable à celle des souches non lysogènes et non colicinogènes. L'induction de colicine par carence en thymine est responsable chez *E. coli* 15 T⁻ de la rapidité caractéristique (6) avec laquelle les cellules de cette souche perdent leur viabilité.

Il existe pour les souches étudiées, une grande similitude d'effet entre l'action des rayons ultraviolets et celle de la carence en thymine. Quel que soit celui de ces deux traitements, irradiation ultraviolette ou carence en thymine, la production de colicine ou de phage λ passe par un maximum lorsque le taux de survie des cultures est d'environ 5 %. De plus, le mutant du prophage λ non inductible par le rayonnement ultraviolet ($\lambda\ ind^-$) n'est pas non plus inductible par la carence en thymine. Les voies métaboliques conduisant à l'induction du développement du phage λ ont vraisemblablement des intermédiaires communs, que l'induction soit déclenchée par les ultraviolets ou par la carence en thymine.

L'importance du rôle de la synthèse des protéines, observée dans le processus de mortalité d'*E. coli* 15 T⁻ (7) semble être liée à l'induction de colicine. Chez une bactérie lysogène, l'absence de synthèse protéique par carence en amino acide empêche l'induction de la synthèse de phage (8). Toutefois, pour la souche TK 211 l'arrêt complet de la synthèse des protéines par carence préalable en aminoacide empêche non seulement l'induction mais aussi la perte de viabilité par carence en thymine.

La perte de viabilité par carence en thymine est le résultat de deux phénomènes qu'il faut clairement distinguer : l'un, contingent, qui dépend de la présence d'un épisome inductible tel que prophage ou facteur colicinogène; l'autre, fondamental et général pour toutes les souches exigeantes en thymine.

(1) T. Okada, K. Yanagisawa et F. J. Ryan, *Nature*, 188, 1960, p. 340-341.
(2) N. E. Melechen et P. D. Skaar, *Virology*, 16, 1962, p. 21-29.
(3) F. J. Ryan, P. Fried et F. H. Mukai, *Biochim. et Biophys. Acta*, 18, 1955, p. 131.
(4) F. H. Mukai, *J. Gen. Microbiol.*, 23, 1960; p. 539-551.
(5) F. Jacob et A. Campbell, *Comptes rendus*, 248, 1959, p. 3219.
(6) H. Barner et S. S. Cohen, *J. Bacteriology*, 68, 1954, p. 80-88.
(7) N. Sicard, *Comptes rendus*, 252, 1961, p. 617.
(8) E. Borek, *Biochim. et Biophys. Acta*, 8, 1952, p. 211-215.

(*Laboratoire du Radiocarbone, Section de Radiobiologie cellulaire, C. N. R. S., Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise.*)

Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 255, p. 1417-1419, séance du 10 septembre 1962.

GAUTHIER-VILLARS & C^ie^,
55, Quai des Grands-Augustins, Paris (6^e^),
Éditeur-Imprimeur-Libraire.
162396

Imprimé en France.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 259 p. 2040-2042 (21 septembre 1964). Groupe 13.

PHYSIOLOGIE MICROBIENNE. — *Importance de l'induction par carence en thymine sur la viabilité des bactéries exigeantes en thymine.* Note de Mme Nicole Sicard, présentée par M. Robert Courrier.

La carence en thymine entraîne, chez les bactéries exigeantes qui ne portent pas d'épisomes inductibles connus, une perte de viabilité. Pour une souche lysogène ou colicinogène, l'augmentation du taux de mortalité est d'autant plus important que le pourcentage de cellules induites est plus grand.

Dans une Note précédente (1), nous avions déjà constaté que la carence en thymine produit, chez les bactéries exigeantes en thymine (T^-) deux effets létaux : l'un commun à toutes les souches d'*Escherichia Coli* étudiées, l'autre additif, lié à la présence d'un épisome inductible, prophage ou facteur colicinogène. Nous avions comparé les survies de cultures carencées d'*E. coli* K 12 thymine-arginine-vitamine B_1^- ($T^-A^-B_1^-$) et ses dérivés lysogènes pour les phages λ non inductible (λ ind$^-$)$^+$ et λ inductible (λ)$^+$. L'absence en thymine provoque l'induction du prophage λ et modifie la viabilité, alors que la souche renfermant le prophage non inductible se comporte comme la souche d'origine. Un récent travail sur l'induction du facteur colicinogène de la souche, *E. coli* 15 T^- suggère de nouveau l'existence de deux effets additifs (2).

Poursuivant l'étude de l'effet létal dû à l'induction, nous avons noté la relation entre le pourcentage de cellules induites et les variations du nombre de bactéries survivantes, au cours de la carence en thymine.

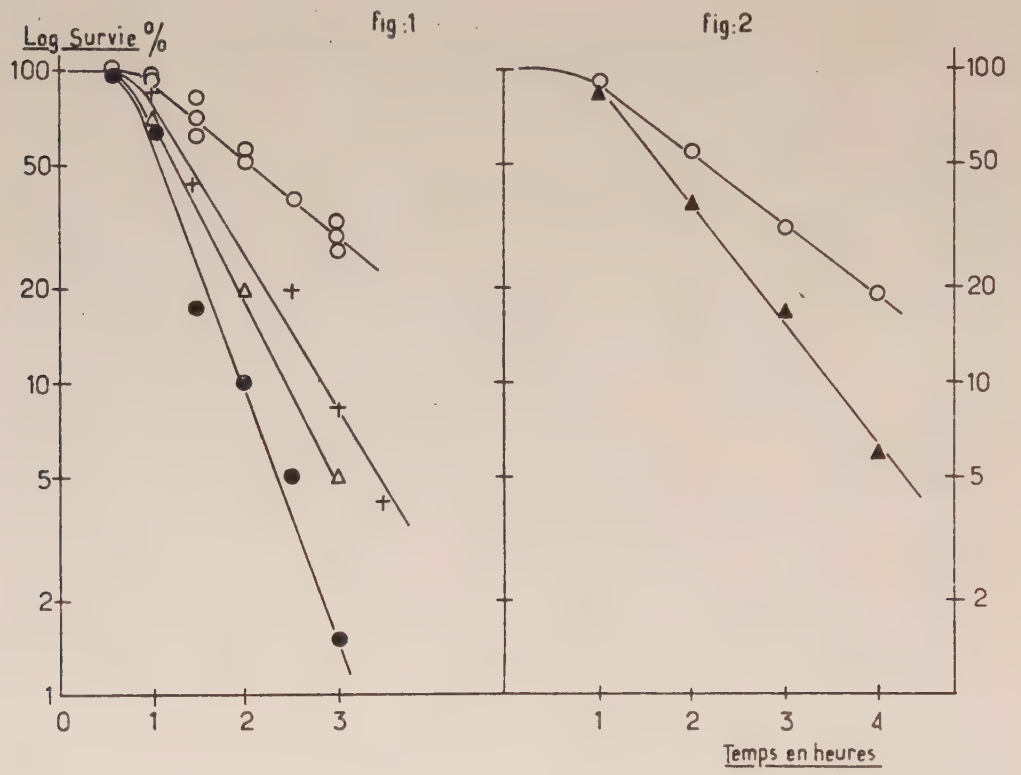
Une culture d'*E. coli* K 12 T A B_1^-(λ)$^-$ est diluée au vingtième dans un milieu minimal et mise à incuber dans un bain-marie à 37° (3). Lorsque le nombre de cellules par millilitre atteint 10^8, les bactéries sont lavées et remises en suspension dans du milieu minimal ne contenant pas de thymine. Des échantillons sont prélevés toutes les 30 mn pour déterminer le nombre de bactéries capables de se multiplier et le nombre de centres infectieux après étalement avec une culture de la souche indicatrice *E. coli* C 600.

Si l'on compare différentes expériences, on observe que les courbes de survie en l'absence de thymine sont différentes et que, pour chacune d'elles, le taux maximal d'induction observé après 2 h 30 mn de carence, varie (*fig.* 1). Plus le pourcentage de cellules induites est élevé, plus la pente de la courbe est grande. On a ainsi une famille de courbes dont la première se confond avec celle de la souche d'origine non lysogène, ou encore, avec celle de la souche lysogène pour le phage non inductible; un taux d'induction de 6 % maximal ne permet pas en effet de discerner une différence de sensibilité, compte tenu des erreurs dues à toutes les manipulations et au comptage des colonies. Les courbes de survie les plus fréquemment observées sont celles pour lesquelles le taux d'induction maximal est de 40 à 60 %.

L'effet létal de l'induction se révèle ainsi additif et d'autant plus important que l'induction est plus grande.

D'autre part, nous avons examiné dans les mêmes conditions, l'effet de la présence dans une bactérie T^- d'un facteur colicinogène.

La même souche d'origine *E. coli* K 12 $T^-A^-B_1$ a été rendue colicinogène par contact avec *E. coli* K 30 $(col\ E_1)^+(col\ V)^-$ (4).



Cultures d'*E. coli* K 12 $T^-A^-B_1^-$ et dérivés, carencées en thymine.

Fig. 1.

E. coli K 12 $T^-A\ B_1^-$: ○
Dérivé $(\lambda\ Ind^-)^-$: ○
» $(\lambda)^-$ induction 6 % : ○
» » 30 % : +
» » 50 % : △
» » 60 % : ●

Fig. 2.

E. coli K 12 T A B_1 : ○
Dérivé $(col)^-$: ▲

La carence en thymine provoque, là encore, une différence de viabilité entre les deux souches, l'une colicinogène, l'autre non (*fig.* 2). Le facteur colicinogène pour la colicine E_1 est induit. La quantité de colicine produite (après 1 h de post-incubation en présence de thymine) est maximale pour un temps de carence de 2 h.

L'interprétation de ces résultats est simple si l'on se rapporte au travail d'Ozeki et coll. (5). Il démontre ce qui avait été supposé depuis longtemps par analogie avec la production de phages par les bactéries lysogènes, à savoir qu'une bactérie qui produit de la colicine est incapable de se multiplier. L'induction révélée par la formation de colicine après étalement et incubation des bactéries en milieu complet, entraîne la mort des bactéries. Ceci explique que la carence en thymine, dont l'effet est inducteur, provoque une diminution de viabilité plus importante pour une souche colicinogène dont le facteur est inductible, que pour une souche non colicinogène. Ces résultats n'ont cependant pas été obtenus par d'autres auteurs (6); mais à partir des données publiées, on peut déduire que les expériences ont été effectuées sur des cultures en phase stationnaire et non pas exponentielle. L'induction est alors extrêmement tardive. D'autre part, si l'irradiation ultraviolette des souches colicinogènes ou non, ne met pas en évidence une nette différence de sensibilité entre les souches, c'est que la fraction de cellules induites obtenue d'après le nombre de lacunes, est au maximum de 22 % (7).

On peut supposer que l'induction serait fonction non seulement des propriétés de l'épisome, mais encore de l'état physiologique de la bactérie elle-même. Plus l'induction se produirait tôt au cours de la carence, plus l'effet létal additif serait manifeste.

L'acquisition d'un prophage ou d'un facteur colicinogène par une souche entraîne donc au cours de la carence en thymine, une perte de viabilité plus importante et cela d'autant plus que le pourcentage de cellules induites atteint au cours de l'expérience est plus grand.

(1) N. Sicard et R. Devoret, *Comptes rendus*, 255, 1962, p. 1417.
(2) H. D. Mennigmann, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 16, n° 4, 1964, p. 373-378.
(3) H. Barner et S. S. Cohen, *J. Bacteriology*, 68, 1954, p. 80-88.
(4) Souche fournie par le Professeur P. Fredericq.
(5) H. Ozeki, B. A. D. Stocker et H. de Margerie, *Nature*, 184, 1959, p. 337-339.
(6) D. Luzzati et M. R. Chevallier, *Ann. Inst. Pasteur*, 1964 (sous presse).
(7) P. Amati, *J. Molecular Biology*, 8, 1964, p. 239-246.

(Laboratoire de Radiobiologie
de l'Institut National des Sciences et Techniques nucléaires,
Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise.)

167304. — Imp. GAUTHIER-VILLARS & Cie, 55, Quai des Grands-Augustins, Paris (6e).
Imprimé en France.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 259 p. 4173-4176 (30 novembre 1964). Groupe 13.

GÉNÉTIQUE MICROBIENNE. — *Activité transformante de l'acide désoxyribonucléique de* Bacillus subtilis *lors de la carence en thymine.* Note (*) de Mme Nicole Sicard et M. Constantin Anagnostopoulos, présentée par M. Robert Courrier.

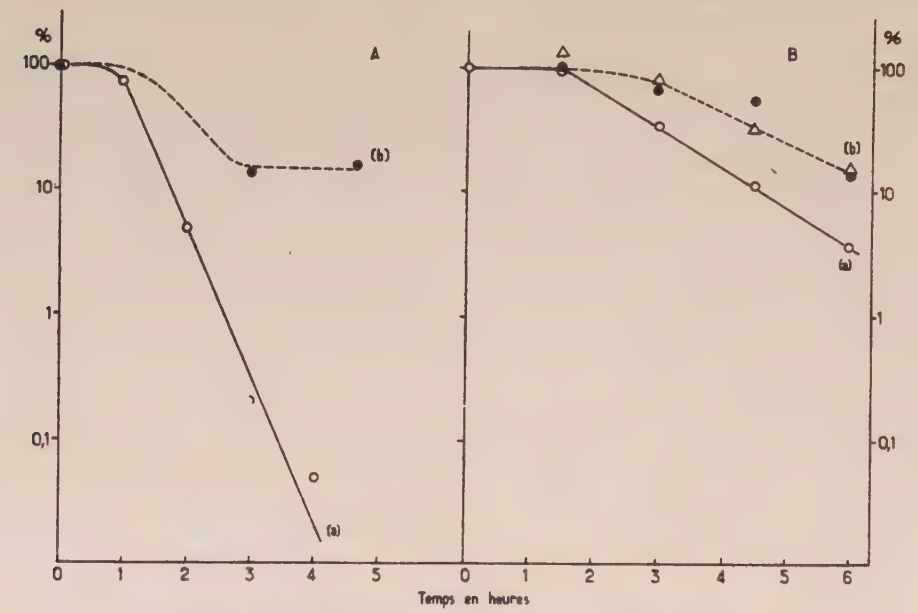
L'activité spécifique du DNA transformant d'une souche de *B. subtilis* exigeante en thymine diminue en fonction du temps de carence. La fraction du DNA qui possède l'activité transformante conserve intacte l'aptitude de transfert simultané de deux marqueurs génétiques liés.

Lors de la carence en thymine la synthèse du DNA d'une culture bactérienne exigeante en thymine est considérablement diminuée tandis que les autres synthèses se poursuivent et les bactéries perdent leur viabilité (1). Dans ces conditions, il est possible que le DNA soit altéré. La transformation génétique offre le moyen de déceler les modifications éventuelles de l'activité biologique. Nous avons donc étudié l'effet de la carence en thymine sur la viabilité et l'activité spécifique du DNA d'un mutant de *B. subtilis*, souche Marburg, 168 T^-, ayant besoin pour sa croissance de tryptophane et de thymine (2).

La souche 168 T^- est d'abord cultivée en milieu minimal contenant du tryptophane et de la thymine. A diverses phases de leur croissance, les bactéries sont récoltées, lavées et remises en suspension dans du milieu frais contenant du tryptophane mais dépourvu de thymine. Les suspensions sont agitées à 37° et à des intervalles précis des échantillons sont prélevés pour la mesure de la densité optique, la détermination du nombre des bactéries capables de former des colonies et l'extraction du DNA. Pour cette dernière opération, les bactéries sont centrifugées et lysées à l'aide de lysozyme. On utilise pour la transformation, soit des lysats bruts, stérilisés par le chloroforme, soit des extraits obtenus comme suit : aux lysats bruts on ajoute de l'alcool; on traite les précipités par une solution de NaCl 2M et l'on recueille les fractions solubles. La quantité de DNA total des préparations est mesurée selon la technique de Burton (3). L'activité transformante est déterminée suivant le protocole décrit par Anagnostopoulos et Spizizen (4). Deux souches différentes ont été utilisées comme réceptrices : l'une exigeant l'isoleucine (il_1^-), l'autre portant deux marqueurs liés ($ilva_1^-$: exigence simultanée pour l'isoleucine et la valine, et leu_1^- : exigence pour la leucine) (5). Les résultats sont identiques avec les deux souches réceptrices en ce qui concerne la variation de l'activité transformante du DNA au cours de la carence en thymine. L'emploi de la souche $ilva_1^-$-leu_1^-, permet de vérifier si la fréquence du transfert simultané des deux marqueurs est modifiée lorsque le DNA donateur provient de cellules carencées. La concentration du DNA, dans les essais de transformation, est de l'ordre

de 0,01 µg/ml ou inférieure afin d'éliminer les doubles transformées résultant de l'absorption simultanée de deux segments différents.

Les résultats des expériences correspondant à deux états physiologiques différents de la culture initiale de la souche 168 T⁻ sont rapportés dans la figure. Le nombre de bactéries viables diminue en fonction de la durée de la carence [courbes (*a*)]. La courbe qui exprime cette diminution a une pente beaucoup plus forte lorsque la culture initiale est en phase exponentielle. Ceci pourrait être dû à l'induction d'un prophage. On observe, en effet, le même phénomène chez les souches d'*Escherichia coli* lysogènes



Survie des bactéries et activité spécifique du DNA transformant au cours de la carence en thymine (*B. subtilis* 168 T⁻).
A. Expérience 1 : culture initiale en phase exponentielle;
B. » 2 : » » stationnaire.
(*a*) *Survie* : en pour-cent du nombre des bactéries initiales ○;
(*b*) *Activité spécifique* : nombre des bactéries transformées par millilitre par millimicrogramme de DNA en pour-cent de l'activité initiale.
△ Lysats bruts;
● DNA précipité par l'alcool.
Souche réceptrice : *ilva⁻-leu⁻*.

pour le phage λ (⁶) et l'on sait que la souche 168 de *B. subtilis* renferme un phage inductible (⁷). La densité optique des cultures dépourvues de thymine croît pendant la première heure, puis diminue jusqu'au tiers environ de la valeur initiale (après 5 h de carence). La lyse de la culture entraîne la perte d'une certaine quantité de DNA.

L'activité spécifique du DNA transformant diminue aussi en fonction du temps de carence [*fig*, courbes (*b*)]. Les courbes sont identiques, qu'il s'agisse de lysats bruts ou de DNA précipité par l'alcool. La cinétique

de l'inactivation du DNA est néanmoins différente de celle de la perte de viabilité. On enregistre au total une perte de 85 % de l'activité du DNA.

Par contre, la fréquence du transfert simultané des deux marqueurs génétiques n'est pas modifiée (tableau). On peut en déduire que les molécules

TABLEAU I.

Fréquence de transfert simultané de deux marqueurs par le DNA *extrait de bactéries carencées en thymine* (168 T⁻).
Souche réceptrice : $ilva_1^-$-leu_1^-.

Expérience. n°	Temps de carence des bactéries donatrices (h).	Transformées $ilva^+$ mμg DNA par ml (*a*).	Doubles transformées $ilva^+$-leu^+ mμg DNA par ml (*b*).	Indice de transformation simultanée $\frac{b}{a}$.
1	0	600	271	0,45
	3	84	40	0,47
	5	95	39	0,41
2	0	1 922	784	0,41
	1 1/2	1 780	877	0,49
	3	1 300	564	0,43
	4 1/2	1 242	461	0,37
	6	260	116	0,45

de DNA qui ont conservé le pouvoir transformant possèdent les deux caractères. Ceci exclut toute action ménagée ou progressive sur le DNA, qui aurait une répercussion sur la valeur de la liaison. Tel est, par exemple, le cas de l'action des désoxyribonucléases ([8]). Si l'on considère que le degré de liaison entre les deux marqueurs n'est pas très élevé (54 % de recombinaison), les segments de DNA transformant intacts doivent être de taille relativement importante. La fraction active pourrait correspondre à des molécules qui n'auraient pas subi de modification. L'induction du prophage ne semble pas jouer un rôle dans l'inactivation du DNA transformant puisque la vitesse avec laquelle les cultures perdent leur viabilité n'influence pas le pourcentage de l'activité transformante résiduelle.

Une inactivation du même ordre du DNA préexistant a été observée après addition de 5-fluorodésoxyuridine dans les cultures de *B. subtilis* de type sauvage ([9]).

Il n'est pas possible actuellement d'expliquer le mécanisme de l'inactivation du DNA lors de la carence en thymine. On ne doit pas néanmoins écarter l'éventualité d'une inactivation par suite d'une synthèse résiduelle du DNA. Cette synthèse atteint 20 % au bout de 3 h de carence pour une culture de *E. coli* 15 T⁻ [([1]), ([10])]. Chez *B. subtilis* elle n'est pas mesurable à cause de la lyse importante des cultures en absence de thymine. Si le DNA néoformé, complétant une chaîne en cours de replication est anormal, toutes les molécules impliquées pourraient être dépourvues d'activité.

(*) Séance du 23 novembre 1964.

(1) H. D. Barner et S. S. Cohen, *J. Bact.*, 68, 1954, p. 80.

(2) Souche fournie par le Professeur J. Spizizen.

(3) K. Burton, *Biochem. J.*, 62, 1956, p. 315.

(4) C. Anagnostopoulos et J. Spizizen, *J. Bact.*, 81, 1961, p. 741.

(5) C. Anagnostopoulos, M. Barat et A. M. Schneider, *Comptes rendus*, 258, 1964, p. 749.

(6) N. Sicard, *Comptes rendus*, 259, 1964, p. 2040.

(7) E. Seaman, E. Tarmy et J. Marmur, *Biochemistry*, 3, 1964, p. 607.

(8) W. F. Bodmer, *Genetics*, 47, 1962, p. 944.

(9) H. D. Mennigmann et W. Szybalski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 1962, p. 398.

(10) N. Sicard, *Comptes rendus*, 252, 1961, p. 617.

(*Laboratoire de Génétique physiologique, C. N. R. S.*
et *Laboratoire de Radiobiologie, I.N.S.T.N.*,
Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise.)

167803. — Imp. Gauthier-Villars & Cie, 55, Quai des Grands-Augustins, Paris (6e).
Imprimé en France.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"DONNEES RECENTES SUR LE SORT DU D N A TRANSFORMANT DANS LA BACTERIE RECEPTRICE"

Vu et approuvé :
Paris, le 4 juillet 1966
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu
et Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean ROCHE